(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.
A23L 1/305 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0091872
(43) 공개일자 2006년08월22일

(21) 출원번호 10-2005-0012604
(22) 출원일자 2005년02월16일

(71) 출원인 충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자 안길환
대전 유성구 지족동 열매마을아파트5단지 510-1202
조명행
서울특별시 양천구 목동 932 현대1차아파트 101동 1004호

(74) 대리인 이동희

심사청구 : 있음

(54) 콜레스테롤 저하 및 항산화 단백질 엔알에프-2의 발현을 증대시키는 식품 조성물

요약

본 발명은 아스타잔틴 0.01~10w%를 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 저하 및 항산화 단백질 Nrf-2의 발현을 증대시키는 식품 조성물을 제공한다.

본 발명에 의한 콜레스테롤 저하 및 항산화 단백질 Nrf-2의 발현을 증대시키는 식품 조성물의 경우, 콜레스테롤이나 중성지방이 많아져 생기는 동맥경화나 관상동맥, 심장질환 같은 고지혈증에 효과를 나타내게 된다. 또한, 본 발명에 의한 콜레스테롤 저하 및 항산화 단백질 Nrf-2의 발현을 증대시키는 식품 조성물의 경우, 각종 질병과 노화의 원인이 되는 활성산소를 제거하여 노화방지 및 면역력을 높여줄 수 있다.

대표도

도 3

색인어

아스타잔틴, 콜레스테롤, 항산화 단백질, Nrf-2

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 일실시예에 의하여 제조된 식품 조성물을 4주 동안 투여한 6주령(a)과 80주령(b) ICR mice의 염색체 이상 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 의하여 제조된 식품 조성물을 4주 동안 투여한 6주령(a)과 80주령(b)의 초생체 소핵 실험 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 의하여 제조된 식품 조성물을 4주와 8주 동안 투여한 ApoE knock out mice(수컷)의 Nrf-2의 protein level의 변화 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 의하여 제조된 식품 조성물을 4주(a)와 8주(b)동안 투여한 ApoE knock out mice(수컷)의 GSH Levels 변화 결과를 나타내는 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 식품 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 콜레스테롤 저하와 항산화 단백질 Nrf-2의 발현을 증대시키는 건강식품 조성물에 관한 것이다.

콜레스테롤은 인체의 기본 단위인 세포를 둘러싸는 막을 구성하고, 여러 호르몬을 만드는데 기본 구조가 되는 물질이다. 이는 신체 필수 물질로서 그 중 HDL(High-density Lipoprotein) 같이 좋은 콜레스테롤도 있으나, LDL(Low-density Lipoprotein) 같은 나쁜 콜레스테롤도 있다.

일반적으로 콜레스테롤은 음식을 통해서 섭취하게 되며, 이는 지방(fat)의 일종이므로 너무 많으면 혈관벽에 엉겨 붙어 혈관을 좁게 만들게 되어, 동맥경화를 야기하게 되고, 심혈관을 좁게 만들면 협심증, 심근경색의 원인이 되며, 뇌의 혈관을 좁게 만들면 뇌졸증의 원인이 된다. 특히 고혈압과 당뇨가 함께 있거나 흡연, 비만, 폐경기 여성에게 있어 콜레스테롤이 높으면 더욱 위험하게 된다.

이와 같은 콜레스테롤의 수치를 낮추기 위하여, 운동이나 식이요법 등을 활용하거나 혹은 콜레스테롤 저하에 효과가 있는 적절한 보조제를 사용할 수도 있다.

그러나, 종래의 효과 물질은 HMG CoA reductase 등의 저해 효과 등을 이용 하는 것으로서, 콜레스테롤로부터 합성되는 호르몬(스테로이드 호르몬 : 남성호르몬)의 양 또한 줄이는 등의 문제점이 있었다.

활성산소는 각종 질병과 노화의 원인들 중의 하나로 밝혀졌으며, 여러 가지 항산화 물질 또는 식품소재들을 탐색하여 활용하려는 연구가 진행되고 있다. 그러나 지금까지의 결과는 활성산소에 의한 다양한 신체손상을 방어하는 데에 한계를 보이고 있다.

따라서, 상기와 같은 문제점을 해결할 수 있는, 즉 부작용 없이 인체에서 콜레스테롤 수치를 낮출 수 있고, 항산화 효능을 갖는 식품 조성물의 개발이 절실히 요청되고 있는 실정이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 아스타잔틴을 이용하여 콜레스테롤 저하 및 항산화 단백질 Nrf-2의 발현을 증대시키는 식품 조성물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아스타잔틴을 이용하여 콜레스테롤 저하 및 항산화 단백질 Nrf-2의 발현을 증대시키는 식품 조성물을 제공한다.

이하에서 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

우선, 본 발명에 의한 식품 조성물은 아스타잔틴을 함유하는데, 본 발명에서의 아스타잔틴은 효모로부터 추출된 생화학적 아스타잔틴과 화학합성 아스타잔틴이 사용된다. 또한, 생화학적 아스타잔틴을 추출하는 효모 자체도 이용된다. 상기의 효모 및 생화학적 아스타잔틴의 공급원으로서 본 발명의 바람직한 실시예에서는 *Xanthophyllomyces dendrorus* 효모를 사용하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 다른 효모 및 다른 효모로부터 추출된 아스타잔틴도 본 발명의 영역에 포함된다.

이 때, 상기의 아스타잔틴은 식품조성물에 0.01~10w%가 함유되는 것이 바람직하다.

또한, 본 발명에 의한 콜레스테롤 저하 및 항산화 단백질 Nrf-2의 발현을 증대시키는 식품 조성물의 경우, 식물스테롤(phytosterol), 타닌, 폴리페놀, 리놀렌산, 오메가-3 지방산, 안토시아닌계 색소 및 베타글루칸으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 물질을 더 포함할 수 있다.

본 발명에 의한 콜레스테롤 저하 및 항산화 단백질 Nrf-2의 발현을 증대시키는 식품 조성물은 액상, 과립상, 분체상, 겔상 등 어떠한 형태로도 제조될 수 있다고 할 것이며, 유제, 정제, 캅셀제, 과립제, 산제, 시럽제 등으로 제조될 수 있다.

유제나 시럽제와 같은 액체 조제물은, 물, 자당, 솔비톨, 과당 등의 당류, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 등의 글리콜류, 참기름, 올리브유, 대두유 등의 유류, p-하이드록시안식향산 에스테르류 등의 방부제, 스트로베리 후레바, 페파민트 등의 후레바류 등을 첨가제로 사용하여 제조할 수 있다.

캅셀제, 정제, 산제, 과립제 등은, 유당, 포도당, 자당, 만니톨 등의 부형제(賦形劑), 전분, 아르긴산나트륨등의 붕괴제, 스테아린산마그네슘, 타르크 등의 활택제, 폴리비닐알콜, 히드록시프로필셀룰로스, 젤라틴 등의 결합제, 지방산에스테르 등의 계면활성제, 글리세린 등의 가소제 등을 첨가제로 사용해서 제조할 수 있다.

이하에서 본 발명을 바람직한 실시예 및 시험예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 본 발명이 이들 실시예 및 시험예에 의하여 한정되는 것으로 해석되어서는 안된다.

실시예 1 : 아스타잔틴 공급원으로서의 효모

본 실시예에서는 아스타잔틴의 공급원으로서 효모 자체를 이용하였다. 효모는 *Xanthophyllomyces dendrorus*가 사용되었다. *Xanthophyllomyces dendrorus* 효모의 cell mass는 제일바이오(안산, 한국)에서 입수하였다. 효모 세포들은 수확 뒤 연속적 원심분리기(50L/H, α-Laval, 스위스)로 세척되었다. 수확된 효모는 50L 반응조(한국발효, 인천, 한국)에서 50-90℃ HCl 처리되었다. 효모 세포는 최종적으로 주입온도 150℃이고 배출온도 85℃ 조건의 분무건조기에서 건조되었다. 효모 전체가 사용되었다.

실시예 2 : 효모로부터 추출한 아스타잔틴을 이용한 식품 조성물의 제조

상기 실시예 1의 *Xanthophyllomyces dendrorus* 효모로부터 아스타잔틴을 추출하였다. 추출된 아스타잔틴에 부형제, 붕괴제, 활택제, 결합제, 계면활성제, 가소제 등의 각종 첨가제를 더하여 과립제로 제조하였다. 본 실시예에서의 각 성분의 구체적인 조성은 아스타잔틴 5w%, 유당 5w%, 포도당 65w%, 자당 5w%, 전분 12w%, 스테아린산 마그네슘 2w%, 젤라틴 2w%, 지방에스테르 2w%, 글리세린 2w%이다.

실시예 3 : 화학합성 아스타잔틴을 이용한 식품 조성물의 제조

화학합성 아스타잔틴은 Hoffman La Roche의 Carophyll Pink(아스타잔틴 8%, 스위스)가 사용되었다. 상기의 Carophyll Pink에 부형제, 붕괴제, 활택제, 결합제, 계면활성제, 가소제 등의 각종 첨가제를 더하여 과립제로 제조하였다. 본 실시예에서의 각 성분의 구체적인 조성은 Carophyll Pink 25w%, 유당 3w%, 포도당 52w%, 자당 3w%, 전분 9w%, 스테아린산 마그네슘 2w%, 젤라틴 2w%, 지방에스테르 2w%, 글리세린 2w%이다.

시험예 1 : 돌연 변이 시험

실험동물은 성장이 빠르고 다방면의 시험과 연구용에 적합한 6주령 ICR mice와 80주령 ICR mice를 1주일 순화시킨 뒤 실험에 사용했고, 각 군당 암수 20마리 이상을 설정하여 연구를 수행하였다. 사육실 온도는 23±2℃, 습도 50±20%를 유

지했으며, light/dark 주기를 12시간으로 하였다. 상기의 실험동물에 실시예 1에 의한 조성물 10g/kg (아스타잔틴 투여량 ≒ 0.04g/kg), 실시예 2에 의한 조성물 0.8g/kg (아스타잔틴 투여량 = 0.04g/kg), 실시예 3에 의한 조성물 2g/kg (아스타잔틴 투여량 = 0.04g/kg)을 4주간 경구투여 하였다. 대조군으로 아스타잔틴을 함유하지 않은 식품조성물이 사용되었다.

상기 조건하에서 기른 ICR mice로부터 splenic(비장) cell을 갈아서 PBS와 섞고, 미리 준비된 histopaque-1077 (Sigma,USA)이 담겨 있는 tube에 이를 동량으로 넣어 400×G에서 30분간 원심분리 후, 층이 생기면 lymphocyte가 포함된 mononuclear cell층 부분을 조심스럽게 뽑아낸다. 1차 배양은 세포 수가 1×10^5cell/mL 되게하고 각, 실험군당 50mL용 culture flask를 사용하여 직립배양을 하였다.

배양조건은 RPMI 완전배지에 36-40시간 동안 incubator(5% CO_2, 포화습도 100%, 37℃)에서 배양하였다. 1차배양이 완료된 후 cell을 원심분리기로 수거하고, RPMI 완전배지에 부유시켰다. 이 세포들 중 hprt-negative mutant를 선별하기 위해 6-thioguanine(6-TG)을 사용한 선택배양을 수행하였다. 세포수가 1×10^5 cell/mL를 기준으로 하여 96 well plate의 well에 2×10^4 cell/0.2mL 되게 하였다. 배양조건은 6-TG 첨가 RPMI 완전배지에 10-15일동안 incubator (5% CO_2, 포화 습도100%, 37℃)에서 배양하였다.

ICR mice에서 Hypoxanthine(guanine) phosphoribosyl transferase gene(*hprt*)의 mutation frequency를 표1, 2에서 나타내었다. Young mice(6주령)의 경우 *hprt* gene의 mutation frequency는 수컷마우스에서 control은 1.35×10^{-6}, 실시예 1은 1.18×10^{-6}, 실시예 2는 1.05×10^{-6}, 실시예 3은 1.53×10^{-6}이었고, 암컷마우스에서는 control이 1.66×10^{-6}, 실시예 1이 1.45×10^{-6}, 실시예 2가 1.08×10^{-6}, 실시예 1.35×10^{-6}로 나타났으며 대조군에 비하여 유의한 변화를 보이지 않았다(표 1).

[표 1] 6주령 ICR mice(수컷)의 4주 투여후 비장 세포에서 hprt gene의 돌연변이 빈도수

sex	group	positive wells/ total wells in 6-thioguanine plates	Po	CE	Mf	MF
male	control	25/700	0.96	0.27	3.64×10^{-7}	1.35×10^{-6}
	실시예 1	22/700	0.97	0.29	3.49×10^{-7}	1.18×10^{-6}
	실시예 2	21/700	0.97	0.30	3.19×10^{-7}	1.05×10^{-6}
	실시예 3	24/700	0.96	0.28	4.23×10^{-7}	1.53×10^{-6}
female	control	28/700	0.96	0.25	4.08×10^{-7}	1.66×10^{-6}
	실시예 1	26/358	0.96	0.26	3.79×10^{-7}	1.45×10^{-6}
	실시예 2	22/365	0.97	0.29	3.19×10^{-7}	1.08×10^{-6}
	실시예 3	25/306	0.97	0.27	3.64×10^{-7}	1.35×10^{-6}

1×10^4 cells/well used for selective medium containing 1μg/ml 6-thioguanine.

Po = P(o)= Number of negative wells / total number of wells.

Mutant Fraction = (-ln Po in TG-plates) / (1×10^5 cells/well).

CE(Clonal Efficiency) = (-ln Po in CE-plates) / (3cells/well).

Mutation frequency(MF) = Mutation Fraction/CE.

또한 Old mice(80주령)의 경우 수컷 마우스에서 control은 1.26×10^{-6}, 실시예 1은 1.26×10^{-6}, 실시예 2는 1.35×10^{-6}, 실시예 3은 1.45×10^{-6}이었고, 암컷마우스에서는 control이 1.77×10^{-6}, 실시예 1이 1.66×10^{-6}, 실시예 2가 2.00×10^{-6}, 실시예 3이 1.55×10^{-6}으로 나타났으며, 역시 대조군에 비하여 유의한 변화를 보이지 않았다(표 2).

[표 2] 80주령 ICR mice(수컷)의 4주 투여후 비장세포에서 hprt gene의 돌연변이 빈도수

sex	group	positive wells/ total wells in 6-thioguanine plates	Po	CE	Mf	MF
male	control	24/700	0.97	0.28	3.49×10^{-7}	1.26×10^{-6}
	실시예 1	24/700	0.97	0.28	3.49×10^{-7}	1.26×10^{-6}
	실시예 2	25/700	0.96	0.27	3.64×10^{-7}	1.35×10^{-6}
	실시예 3	26/700	0.96	0.26	3.79×10^{-7}	1.45×10^{-6}
female	control	29/700	0.96	0.24	4.23×10^{-7}	1.77×10^{-6}
	실시예 1	28/358	0.96	0.25	4.08×10^{-7}	1.66×10^{-6}
	실시예 2	31/365	0.96	0.23	4.53×10^{-7}	2.00×10^{-6}
	실시예 3	27/306	0.96	0.25	3.93×10^{-7}	1.55×10^{-6}

1×10^{4} cells/well used for selective medium containing 1㎍/ml 6-thioguanine.

Po = P(o) = Number of negative wells / total number of wells.

Mutant Fraction = (-ln Po in TG-plates) / (1×10^{5} cells/well).

CE(Clonal Efficiency) = (-ln Po in CE-plates) / (3cells/well).

Mutation frequency(MF) = Mutation Fraction/CE.

시험예 2 : 염색체 이상 시험

실험동물은 성장이 빠르고 다방면의 시험과 연구용에 적합한 6주령 ICR mice와 80주령 ICR mice를 1주일 순화시킨 뒤 실험에 사용했고, 각 군당 암수 20마리 이상을 설정하여 연구를 수행하였다. 사육실 온도는 23±2℃, 습도 50±20%를 유지했으며, light/dark 주기를 12시간으로 하였다. 상기의 실험동물에 실시예 1에 의한 조성물 10g/kg (아스타잔틴 투여량 ≒ 0.04g/kg), 실시예 2에 의한 조성물 0.8g/kg (아스타잔틴 투여량 = 0.04g/kg), 실시예 3에 의한 조성물 2g/kg (아스타잔틴 투여량 = 0.04g/kg)을 4주간 경구투여 하였다. 대조군으로 아스타잔틴을 함유하지 않은 식품조성물이 사용되었다.

ICR mice로부터 splenic(비장) cell을 갈아서 멸균된 PBS와 섞고, 미리 준비된 histopaque-1077(sigma, USA)가 담겨 있는 tube에 이를 동량으로 넣어 400 G에서 30분간 원심분리 후, 층이 생기면 lymphocyte가 포함된 mononuclear cell층 부분을 조심스럽게 뽑아낸다.

Washing과정을 위해 10㎖의 PBS와 섞고 250 G에서 10분간 원심분리하는 과정을 2번 반복 한 후 0.5㎖의 PBS에 resuspend하여 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI 완전 배지에 48-72 시간동안 incubator(5% CO2, 포화습도, 30)에서 배양하였다. 48-72 시간 배양 후 colcemid(Gibco, 120-0574)를 최종농도 0.2 ㎍/㎖가 되도록 각 dish에 처리하였다.

Colcemid 처리 후 2 시간 더 배양한 다음 분열중기세포를 수거, 1,000rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고, 저장액(0.075M KCl)을 가하여 37℃ 수욕상에서 15분간 처리하였다. 이를 다시 원심분리하여 상층액을 제거한 후 냉각된 고정액(MeOH : Acetic acid = 3 : 1 v/v)을 가하여 5분, 다시 원심분리하여 30분간 전고정을 행한 뒤 원심분리하여 고정

액을 2회 더 교환하였다. 공기건조법으로 염색체 표본을 만들고 5% Giemsa액으로 염색하였다. 결과의 판정은 실험군당 100개의 잘 퍼진 분열중기상을 관찰한 다음 구조 이상의 총 출현 빈도를 구하고 $p<0.05$ 및 $p<0.01$ 수준으로 chi-square test에 의해 통계처리 하였다. 염색체 이상 판정 criteria에서는 gap의 크기가 염색체 두께보다 작은 chromatid gap과 chromosome gap은 포함시키지 않았다.

Young mice (6주령)의 경우 각 시험용량군의 염색체이상세포의 출현빈도는(%) 수컷마우스에서 control이 1.4±0.89, 실시예 1이 1.6±0.55 실시예 2가 1.4±0.89, 실시예 3이 1.2±0.84 이었고, 암컷마우스에서는 control이 1.2±0.55, 실시예 1이 1.2±0.84, 실시예 2가 1.4±0.89, 실시예 3이 1.4 ±0.55로 나타났으며 대조군에 비하여 시험군의 염색체이상 세포의 출현빈도는 유의한 변화를 보이지 않았다(도 1a).

또한 Old mice(80주령)의 경우 수컷마우스에서 control이 3.04±0.84, 실시예 1이 3.2±0.84, 실시예 2가 3.0±1.22, 실시예 3이 3.2±0.45 이었고, 암컷마우스에서는 control이 3.2±0.84, 실시예 1이 3.0±0.71, 실시예 2가 3.2±0.84, 실시예 3이 3.0±1.22로 나타났으며 역시 대조군에 비하여 시험군의 염색체 이상세포의 출현빈도는 유의한 변화를 보이지 않았다(도 1b).

시험예 3 : 초생체 소핵 시험

실험동물은 성장이 빠르고 다방면의 시험과 연구용에 적합한 6주령 ICR mice와 80주령 ICR mice를 1주일 순화시킨 뒤 실험에 사용했고, 각 군당 암수 20마리 이상을 설정하여 연구를 수행하였다. 사육실 온도는 23±2℃, 습도 50±20%를 유지했으며, light/dark 주기를 12시간으로 하였다. 상기의 실험동물에 실시예 1에 의한 조성물 10g/kg (아스타잔틴 투여량 ≒ 0.04g/kg), 실시예 2에 의한 조성물 0.8g/kg (아스타잔틴 투여량 = 0.04g/kg), 실시예 3에 의한 조성물 2g/kg (아스타잔틴 투여량 = 0.04g/kg)을 4주간 경구투여 하였다. 대조군으로 아스타잔틴을 함유하지 않은 식품조성물이 사용되었다.

상기와 같은 환경하에서 양육한 ICR mice로부터 5-10 ㎕의 혈액을 뽑아 먼저 70℃ 로 데워진 슬라이더에 acridine orange (AO, 1 mg/ml, Sigma)를 30-50 ㎕ 잘펴서 그 위에 5-10 ㎕의 혈액을 도말하여 슬라이드를 4℃에서 2시간 동안 말렸다. 현미경 1,000배의 배율 하에서 2,000개의 망상적혈구(reticulocyte)에서 비정상적인 염색체 성분인 소핵을 형광염색하여 관찰하였다. 비율은 $p<0.05$, 0.01 수준으로 chi-square test에 의하여 대조군과의 통계적 유의성을 검정하였다.

Young mice(6주령)와 Old mice(80주령)의 말초혈액내의 망상적혈구 (reticulocyte)에서 비정상적인 염색체 성분인 소핵을 형광 염색하여 관찰한 결과를 도 2에 나타내었다. 망상적혈구 2000개당 소핵의 출현빈도를(%) 관찰한 결과 Young mice(6주령)의 경우 수컷 마우스에서 control이 2.12±0.55, 실시예 1이 1.98±0.89, 실시예 2가 2.0±1.44, 실시예 3이 1.98±0.44 이었고, 암컷마우스에서는 control이 2.34±0.64, 실시예 1이 2.08±0.30, 실시예 2가 2.78±0.71, 실시예 3이 2.08±0.30으로 나타났으며 대조군에 비하여 유의한 변화를 보이지 않았다 (도 2a).

또한 Old mice(80주령)의 경우 수컷마우스에서 control이 4.02±0.96, 실시예 1이 4.06±1.21, 실시예 2가 4.94±2.95, 실시예 3이 5.04±1.40 이었고, 암컷마우스에서는 control이 3.32±1.02, 실시예 1이 3.84±1.03, 실시예 2가 3.88±0.91, 실시예 3이 3.94±0.83으로 나타났으며 역시 대조군에 비하여 유의한 변화를 보이지 않았다(도2b).

시험예 4 : 혈액학적 검사

실험동물은 성장이 빠르고 다방면의 시험과 연구용에 적합한 6주령 ICR mice를 1주일 순화시킨 뒤 실험에 사용했고, 암수 20마리 이상을 설정하여 연구를 수행하였다. 사육실 온도는 23±2℃, 습도 50±20%를 유지했으며, light/dark 주기를 12시간으로 하였다. 상기의 실험동물에 실시예 1에 의한 조성물 10g/kg (아스타잔틴 투여량 ≒ 0.04g/kg), 실시예 2에 의한 조성물 0.8g/kg (아스타잔틴 투여량 = 0.04g/kg), 실시예 3에 의한 조성물 2g/kg (아스타잔틴 투여량 = 0.04g/kg)을 4주간 경구투여 하였다. 대조군으로 아스타잔틴을 함유하지 않은 식품조성물이 사용되었다.

상기와 같은 환경하에서 양육한 ICR mice를 부검전 1일간 절식시킨 후, 안와 정맥총 및 복부 대동맥에서 채혈한다. 채혈한 혈액은 항응고제로 EDTA가 함유된 채혈병에 넣어 자동혈액검사기기를 이용하여 혈액학적 헤마토크리트치(hematocrit, HCT), 적혈구수(red blood cell, RBC), 백혈구수(white blood cell, WBC), 백혈구 백분율[Neutrophil(NE), Lymphocyte(LY), Monocyte(MO), Eosinophil(EO), Basophil(BA)] 혈액응고시간[Prothrombin time(PT), Partial Thromboplastin Time(PTT)], 혈소판수(blood platelet, PLT) 등을 측정하였다.

부검시의 혈액학적 검사소견에서는 모든 항목에서 대조군과 비교하여 유의할만한 변화를 관찰하지 못하였다(표 3, 4).

[표 3] 6주령 ICR mice(수컷)의 4주 투여후 혈액학적 검사

group	control	실시예 1	실시예 2	실시예 3
PLT(K/㎕)	758.80±90.40	721.00±53.46	761.00±96.73	788.00±78.25
WBC(K/㎕)	6.14±3.40	6.05±0.53	6.92±3.75	6.53±2.13
RBC(M/㎕)	8.90±3.32	8.45±1.93	8.22±4.31	8.74±2.23
Hb(g/dL)	11.22±3.55	11.12±1.92	11.28±4.87	11.48±2.70
HCT(%)	71.68±19.46	75.30±18.78	72.70±22.26	75.82±13.70
MCV(fl)	54.06±3.43	55.08±6.77	54.18±14.99	56.30±6.71
MCH(pg)	11.42±1.86	11.76±1.62	11.52±1.71	11.48±1.70

Data are means±standard deviation, n=10

*Significantly different from control at $p<0.05$

**Significantly different from control at $p<0.01$

[표 4] 6주령 ICR mice(암컷)의 4주 투여후 혈액학적 검사

group	control	실시예 1	실시예 2	실시예 3
PLT(K/㎕)	719.40±69.39	735.60±72.28	732.14±64.10	710.80±37.56
WBC(K/㎕)	5.19±4.11	5.18±3.41	4.94±1.91	5.09±1.19
RBC(M/㎕)	8.55±2.16	8.64±3.94	8.66±3.14	8.36±2.42
Hb(g/dL)	11.02±2.51	10.60±2.38	11.50±2.74	11.60±1.92
HCT(%)	63.02±18.24	64.40±15.85	67.02±17.29	64.14±18.88
MCV(fl)	55.70±6.45	55.08±5.66	57.96±4.00	55.44±2.35
MCH(pg)	11.14±1.58	10.96±1.76	10.84±1.82	11.36±1.71
MCHC(g/dl)	21.64±3.55	21.72±2.33	22.96±2.02	22.06±2.16

Data are means±standard deviation, n=10

*Significantly different from control at $p<0.05$

**Significantly different from control at $p<0.01$

시험예 5 : 혈액생화학적 검사

실험동물은 80주령 ICR mice를 1주일 순화시킨 뒤 실험에 사용했고, 암수 20마리 이상을 설정하여 연구를 수행하였다. 사육실 온도는 23±2℃, 습도 50±20%를 유지했으며, light/dark 주기를 12시간으로 하였다. 상기의 실험동물에 실시예 1에 의한 조성물 10g/kg (아스타잔틴 투여량 ≒ 0.04g/kg), 실시예 2에 의한 조성물 0.8g/kg (아스타잔틴 투여량 = 0.04g/kg), 실시예 3에 의한 조성물 2g/kg (아스타잔틴 투여량 = 0.04g/kg)을 4주간 경구투여 하였다. 대조군으로 아스타잔틴을 함유하지 않은 식품조성물이 사용되었다.

안와 정맥총 및 복부대동맥에서 채혈한 혈액중 일부를 혈액학적 검사로 이용하고, 나머지 혈액은 4℃ 냉장 보관한 후 원심분리 (3000rpm, 10min)하여 자동생화학검사기 (PRIME)를 이용하여 혈청단백(total protein, TPROT), 알부민(albumin, ALB), 빌리루빈(total bilirubin, TBILI), 트랜스아미나제 [(aspartate aminotransferase, AST), (alanine amino transferase, ALT), 혈당 (glucose, GLU), 크레아티닌(creatinine, CREAT), 요소질소(blood urea nitrogen, BUN), 칼슘(calcium, CA), 인(phosphorus, P)을 측정한다. ALT, ALP 등은 반응 온도에 따라 검사결과가 달라질 수 있으므로 30℃를 기준으로 하여 측정하였다.

부검시의 혈액생화학적 검사소견에서는 모든 항목에서 대조군과 비교하여 유의할만한 변화를 관찰하지 못하였다(표 5, 6)
.

[표 5] 80주령 ICR mice(수컷)의 4주 투여후 혈액학적 검사

group	control	실시예 1	실시예 2	실시예 3
PLT(K/㎕)	735.40±98.57	711.60±73.08	707.20±60.89	697.80±136.67
WBC(K/㎕)	7.25±2.42	8.11±1.21	7.72±2.75	7.96±1.55
RBC(M/㎕)	7.30±3.49	8.00±1.22	7.22±1.11	7.53±1.13
Hb(g/dL)	8.00±3.25	8.88±1.71	7.72±1.49	7.70±1.48
HCT(%)	41.06±17.91	48.26±6.15	50.98±6.66	41.56±9.71
MCV(fl)	59.12±3.74	58.96±7.45	61.12±12.10	60.06±6.89
MCH(pg)	11.54±2.78	11.12±1.76	10.02±2.41	12.34±1.36
MCHC(g/dl)	20.06±3.96	18.34±2.21	16.02±8.04	18.96±3.44

Data are means±standard deviation, n=10

*Significantly different from control at p<0.05

**Significantly different from control at p<0.01

[표 6] 80주령 ICR mice(암컷)의 4주 투여후 혈액학적 검사

group	control	실시예 1	실시예 2	실시예 3
PLT(K/㎕)	577.20±172.92	562.40±106.93	547.60±107.99	567.40±82.17
WBC(K/㎕)	6.41±2.00	6.31±2.32	5.80±2.63	6.46±1.61
RBC(M/㎕)	8.06±1.15	7.95±2.47	7.84±1.74	7.94±1.13
Hb(g/dL)	9.78±1.40	10.12±2.92	9.56±1.27	10.38±2.57
HCT(%)	75.52±9.65	69.52±11.91	73.36±11.38	77.70±8.78
MCV(fl)	55.70±6.45	55.08±5.66	57.96±4.00	55.44±2.35
MCH(pg)	12.18±0.86	12.94±1.72	12.32±1.00	12.74±1.05
MCHC(g/dl)	15.56±4.53	17.84±2.00	17.66±1.21	15.76±2.05

Data are means±standard deviation, n=10

*Significantly different from control at p<0.05

**Significantly different from control at p<0.01

시험예 6 : Nrf-2(NF-E2-related factor 2)의 Western Blotting

실험동물은 Apoprotein E를 없앤 6주령 Apoprotein E(ApoE) knock out mice를 1주일 순화시킨 뒤 실험에 사용했고, 수컷 5마리 이상을 설정하여 연구를 수행하였다. 상기의 실험동물에 실시예 1에 의한 조성물 10g/kg (아스타잔틴 투여량 ≒ 0.04g/kg), 실시예 2에 의한 조성물 0.8g/kg (아스타잔틴 투여량 = 0.04g/kg), 실시예 3에 의한 조성물 2g/kg (아스타잔틴 투여량 = 0.04g/kg)을 4주간 경구투여 하였다. 대조군으로 아스타잔틴을 함유하지 않은 식품조성물이 사용되었다.

Apoprotein E(ApoE) knock out mice 조직(Liver)을 lysis buffer로 [pH 8의 50mM Tris, 150mM NaCl, 0.02% sodium azide, 1% sodium dodesyl sulfate(SDS), 100ug/ml phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), aprotinin 1uL/mL, 1% igapel 630(Sigma Chemical Co., St. Louis,MO), 0.5% deoxychoate] 추출하여 30분동안 14,000g에서 원심분리하였다.

단백질 농도는 Bradford analysis kit(Bio-Rad,Hercules,CA,USA)를 사용하여 정량하였다.

같은 양의 단백질을 12%-SDS polyacrylamide gel에서 분리하여 nitrocellulose membrane (Hybond ECL; Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ)에 옮겼다. Blocking buffer (0.1% Tween 20을 포함한 TTBS buffer에 10% nonfat milk)로 실온에서 2시간 동안 blocking했다. Membrane은 1시간 동안 실온에서 특정한 항체들로 incubation하였다.

Nrf-2와 actin(Santa Cruz Biotechnology,Inc.,Santa Cruz,CA)에 대한 마우스 단일항체를 이 연구에서 사용하였다. 항체들은 제조사에 기입된 희석으로 사용되었다. TTBS로 세척한 후에 membrane을 sheep 항-마우스 horseradish peroxidase(HRP)-labeled 이차 항체로 다시 incubation하였다. 그리고 electrochem-iluminescense(ECL) detection kit(Amersham Pharmacia Biotech Inc.,Piscataway,NJ)를 사용하여 LAS-3000(FUJI, Japan) 으로 검출하였다.

Apoprotein E (ApoE) knock out mice의 간에서 Nrf-2의 protein level의 변화를 관찰한 결과 4주 투여군과 8주 투여군 모두 실시예 1과 실시예 3에서 protein level이 증가하였다(도 3).

시험예 7 : Glutathione Test Measurement of GSH Levels

실험동물은 콜레스테롤과 중성지방의 조절에 기여하는 Apoprotein E를 없앤 6주령 Apoprotein E(ApoE) knock out mice를 1주일 순화시킨 뒤 실험에 사용했고, 수컷 5마리 이상을 설정하여 연구를 수행하였다. 상기의 실험동물에 실시예 1에 의한 조성물 10g/kg (아스타잔틴 투여량 ≒ 0.04g/kg), 실시예 2에 의한 조성물 0.8g/kg (아스타잔틴 투여량 = 0.04g/kg), 실시예 3에 의한 조성물 2g/kg (아스타잔틴 투여량 = 0.04g/kg)을 4주간 경구투여 하였다. 대조군으로 아스타잔틴을 함유하지 않은 식품조성물이 사용되었다.

Apoprotein E(ApoE) knock out mice 조직(Liver)을 떼어내어 적당량의 0.1 M pH 8.0 phosphate buffer를 가한 후 homogenizer로 균질화 하였다. 적량의 균질액을 같은 양의 4% sulfosalicyclic acid와 섞어서 즉시 vortex 하여 단백질이 침전된 균질액을 3500rpm, 30분, 30℃의 조건에서 원심분리하였다. 상층액을 적당량 뽑아내어 DTNB woking solution과 1:9의 부피비로 섞어서 ELISA reader(Bio-Rad 680, USA)로 412 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다.

Apoprotein E (ApoE) knock out mice의 간에서 GSH Levels의 변화를 관찰한 결과 4주 투여군(도 4a)에서는 통계적으로 유의할 만한 변화를 관찰할 수 없었고, 8주 투여군(도 4b)에서는 실시예 1의 GSH Level이 증가하였다.

시험예 8 : 혈청내 level 조사를 통한 새로운 기능성 탐색

실험동물은 콜레스테롤과 중성지방의 조절에 기여하는 Apoprotein E를 없앤 6주령 Apoprotein E (ApoE) knock out mice를 1주일 순화시킨 뒤 실험에 사용했고, 수컷 5마리 이상을 설정하여 연구를 수행하였다. 상기의 실험동물에 실시예 1에 의한 조성물 10g/kg (아스타잔틴 투여량 ≒ 0.04g/kg), 실시예 2에 의한 조성물 0.8g/kg (아스타잔틴 투여량 = 0.04g/kg), 실시예 3에 의한 조성물 2g/kg (아스타잔틴 투여량 = 0.04g/kg)을 4주간 경구투여 하였다. 대조군으로 아스타잔틴을 함유하지 않은 식품조성물이 사용되었다.

Apoprotein E (apoE) knock out mice의 안와 정맥총 및 복부대동맥에서 채혈한 혈액에서 혈청단백(total protein, TPROT), 알부민(albumin, ALB), 트랜스아미나제[(aspartate aminotransferase, AST), (alanine amino transferase, ALT), Total cholesterol, 중성지질(Triacylglycerols)을 측정하였다.

Apoprotein E (ApoE) knock out mice에서 혈청단백(total protein, TPROT), 알부민(albumin, ALB), 트랜스아미나제[(aspartate aminotransferase, AST), (alanine aminotransferase, ALT), Total cholesterol, 중성지질(Triacylglycerols)을 측정한 결과 Total cholesterol이 감소하였고 나머지 항목은 통계적으로 유의할 만한 변화를 관찰할 수 없었다(표 7).

[표 7] 혈청내 level 조사

Group	Control	실시예 1	실시예 2	실시예 3
Total Protein (g/dl)	6.09±1.23	6.44±2.11	6.38±1.76	6.32±1.44
Albumin (g/dl)	4.92±0.99	4.21±0.76	4.82±0.53	4.53±0.62
ALT (u/l)	44.29±3.21	40.50±5.03	42.78±5.92	40.26±6.29
AST (u/l)	60.32±6.89	63.10±5.27	66.99±6.76	64.80±8.52
Total cholesterol (mg/dl)	803.7±55.3	609.3±44.6	642.4±51.0	614.9±58.4
Triacylglycerols (mg/dl)	80.34±12.44	79.33±10.32	77.29±13.21	76.48±13.37

발명의 효과

상기한 바와 같이, 본 발명에 의한 콜레스테롤 저하 및 항산화 단백질 Nrf-2의 발현을 증대시키는 식품조성물의 경우, 콜레스테롤 수치를 감소시키게 됨으로써 동맥경화나 관상동맥 심장질환 같은 고지혈증에 효과를 나타내게 된다.

또한, 본 발명에 의한 콜레스테롤 저하 및 항산화 단백질 Nrf-2의 발현을 증대시키는 식품조성물의 경우, 항산화 단백질 Nrf-2의 발현을 증대시킴으로써, 각종 질병과 노화의 원인이 되는 활성산소를 제거하여 노화방지 및 면역력을 높여주게 된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

아스타잔틴을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 저하 및 항산화 단백질 Nrf-2의 발현을 증대시키는 식품조성물.

청구항 2.

제1항에 있어서,

상기의 아스타잔틴의 함유량이 0.01~10w% 임을 특징으로 하는 콜레스테롤 저하 및 항산화 단백질 Nrf-2의 발현을 증대시키는 식품조성물.

청구항 3.

제1항 내지 제2항의 어느 한 항에 있어서,

상기의 아스타잔틴은 효모, 효모로부터 얻어지는 생화학적 아스타잔틴 또는 화학합성 아스타잔틴 임을 특징으로 하는 콜레스테롤 저하 및 항산화 단백질 Nrf-2의 발현을 증대시키는 식품조성물.

청구항 4.

제3항에 있어서,

상기의 효모는 *Xanthophyllomyces dendrorus* 임을 특징으로 하는 콜레스테롤 저하 및 항산화 단백질 Nrf-2의 발현을 증대시키는 식품조성물.

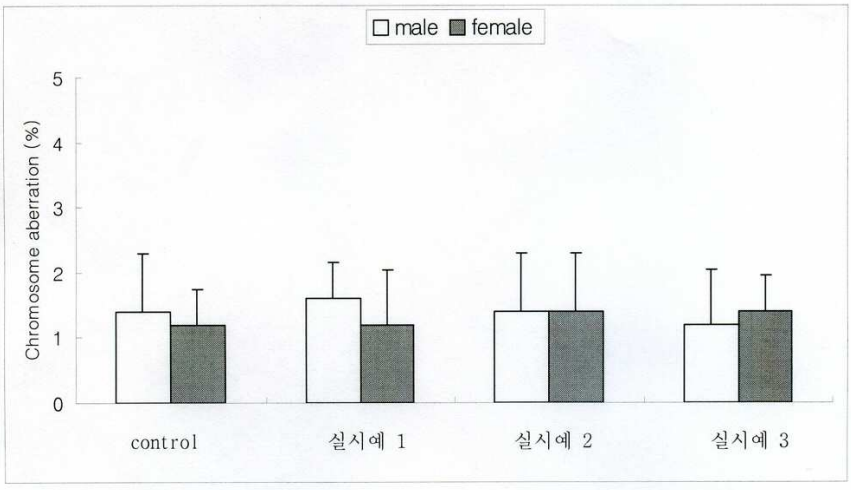
청구항 5.

제1항 내지 제2항의 어느 한 항에 있어서,

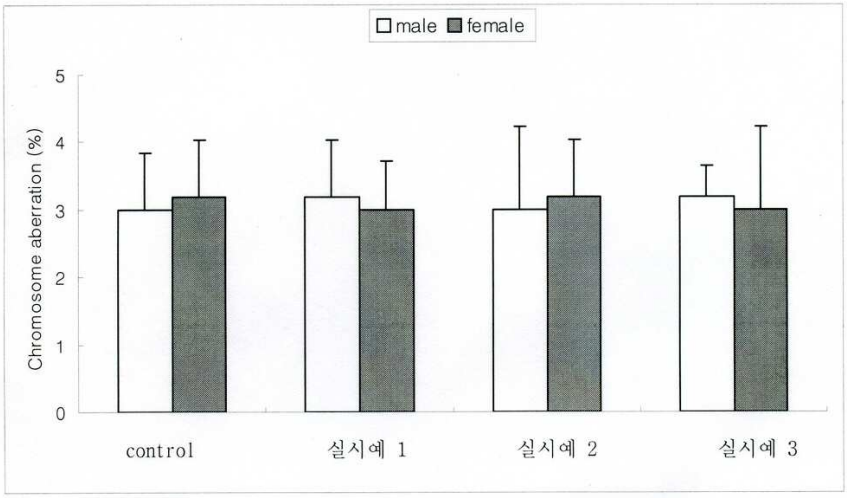
식물스테롤(phytosterol), 타닌, 폴리페놀, 리놀렌산, 오메가-3 지방산, 안토시아닌계 색소 및 베타글루칸으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 물질을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 저하 및 항산화 단백질 Nrf-2의 발현을 증대시키는 식품조성물.

도면

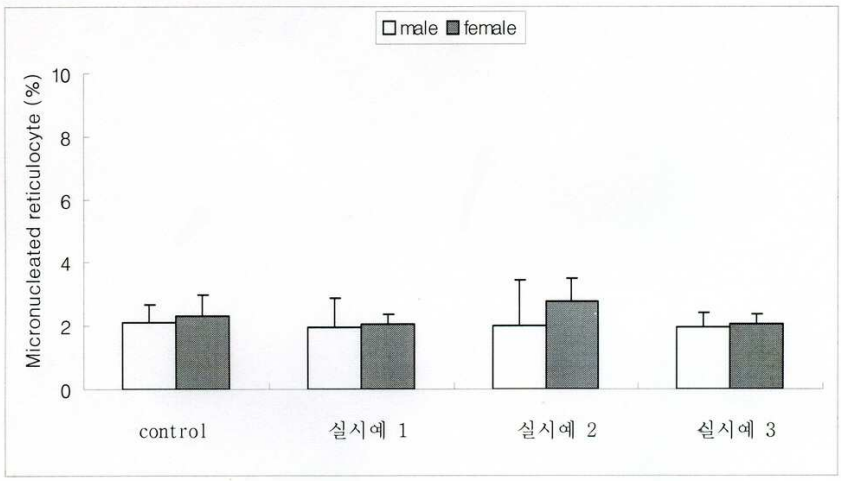
도면1a



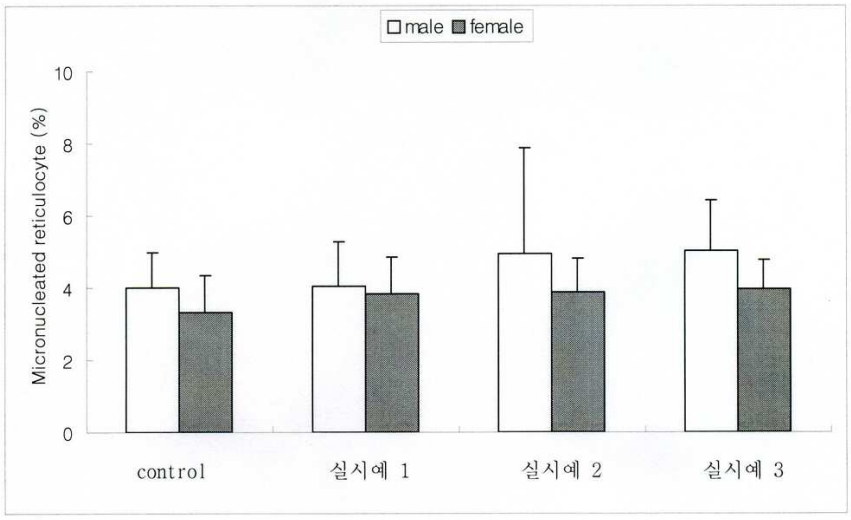
도면1b



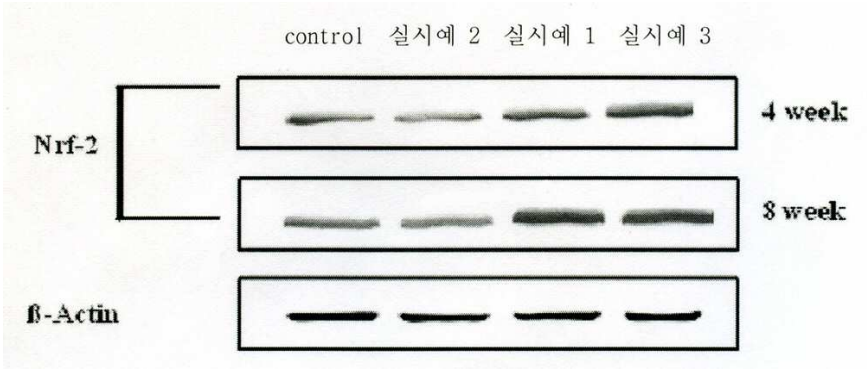
도면2a



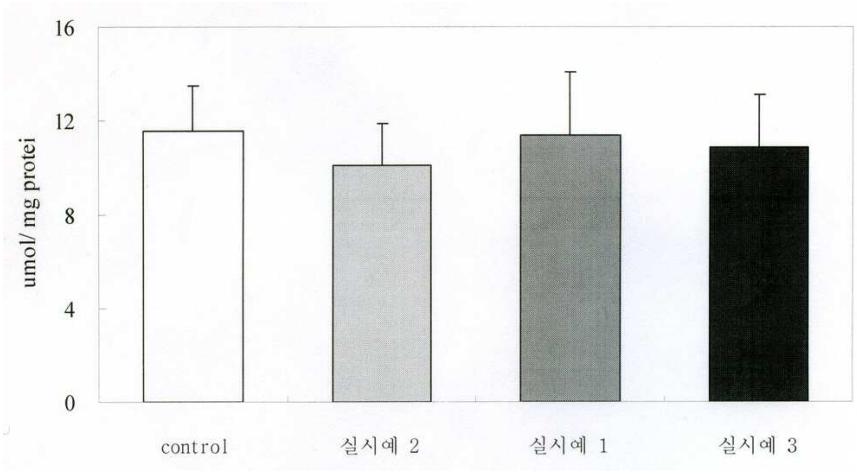
도면2b



도면3



도면4a



도면4b

